— 1950. *EM-Untersuchungen an Polplasmen von Tubifex und an Mikromeren von Paracentrotus.* Arch. Klaus-Stift. Vererbforsch. 25: 612-619.

LEHMANN, F. E., HENZEN M. und GEIGER F. 1962. *Cytology and microcytology of living and fixed cytoplasmic constituents in the eggs tubifex and the cell of amoeba proteus.* Symp. Int. Soc. Cell Biol. 1: 119-127.

— und MANCUSO V. 1957. *Improved fixative for astral rays and nuclear membrane of Tubifex embryos.* Exp. Cell Res. 13: 161-164.

— und MANCUSO V. 1958. *Der fibrilläre Feinbau des Mitoseapparates von Tubifex nach Behandlung mit verschiedenen Fixiermitteln.* Rev. suisse Zool. 65: 360-371.

v. PARSEVAL, M. 1922. *Die Entwicklung zentrifugierter Eier von Tubifex riv.* Roux' Arch. Entw Mech. 50: 468-497.

PENNERS, A. 1934. *Experimentelle Untersuchungen zum Determinationsproblem am Keim von Tubifex: Abtöten der Teloblasten auf verschiedenen Entwicklungsstadien des Keimstreifs.* Z. wiss. Zool. 145: 389-399.

— 1937. *Regulation am Keim von Tubifex nach Ausschalten des ektodermalen Keimstreifs.* Z. wiss. Zool. 149: 86-130.

WEBER, R. 1958. *Ueber die submikrospische Organisation und die biochemische Kennzeichnung embryonaler Entwicklungsstadien von Tubifex.* Roux' Arch. Entw Mech. 150: 542-580.

WOKER, H. 1944. *Die Wirkung des Colchicins auf Furchungsmitosen und Entwicklungsleistungen des Tubifexeis.* Rev. suisse Zool. 51: 109-170.

N° 21. **M. Lüscher und I. Walker,** — Zur Frage der Wirkungsweise der Königinnenpheromone bei der Honigbiene.[1] (Mit 4 Textabbildungen.)

Abteilung für Zoophysiologie, Zoologisches Institut der Universität Bern.

Die von BUTLER (1954), PAIN (1954) und VOOGD (1955) nachgewiesene Königinnensubstanz („queen substance") hat verschiedene Wirkungen auf die Arbeiterinnen. Sie hemmt die Entwicklung von Eiern in den Ovarien und verhindert damit die Entstehung

[1] Mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds. Wir danken der Direktion der Bienenabteilung der Eidgenössischen Milchwirtschaftlichen Versuchsanstalt Liebefeld-Bern, die uns in grosszügiger Weise Arbeitsplatz und Material zur Verfügung gestellt hat. Herrn W. Fyg danken wir herzlich für seine wertvolle Beratung.

von Afterweiseln (Drohnenmütterchen). Daneben beeinflusst sie das Verhalten, indem sie einerseits attraktiv wirkt, andererseits den Bau von Ersatzweiselzellen verhindert. Diese Wirkung auf den Bau von Ersatzweiselzellen ist einem Pheromon zuzuschreiben, der 9-Oxo-decen (2) carbonsäure, die vor kurzem synthetisiert werden konnte (Barbier und Lederer 1960, Barbier, Lederer und Nomura 1960, Callow und Johnston 1960). Die Eireifung wird jedoch durch diese Substanz nicht beeinflusst (Pain 1961a). Die Ovarhemmung muss also auf der Wirkung eines weiteren, im Totalextrakt von Königinnen enthaltenen Pheromons beruhen. Für die Attraktivwirkung schliesslich scheint ein Gemisch mehrerer Substanzen des Totalextraktes notwendig zu sein. Die Wirkungen der Königinnensubstanz beruhen also auf der Wirkung mehrerer in ihr enthaltener Pheromone.

Über die physiologische Wirkungsweise dieser Pheromone ist bis jetzt nur wenig bekannt. Nachdem bei Termiten gezeigt werden konnte, dass die Pheromone der Geschlechtstiere mindestens zum Teil in das endokrine System der Larven eingreifen (Lüscher 1961), war anzunehmen, dass auch bei Bienen eine ähnliche Beziehung zwischen den Pheromonen und den Hormonen bestehen könnte. Wir haben nun diese Frage zunächst für das die Eireifung hemmende Pheromon untersucht.

Bei vielen, jedoch nicht bei allen Insekten sind die Corpora allata für die Eireifung notwendig. Auch bei Bienen bestehen Anhaltspunkte dafür, dass ein Hormon der Corpora allata an der Eireifung beteiligt ist. Müssbichler (1952) fand eine Volumenzunahme der Corpora allata bei eierlegenden Arbeiterinnen, den sog. Afterweiseln. Müssbichler konnte jedoch die Entstehung von Afterweiseln durch Implantation von Corpora allata nicht beeinflussen. Altmann (1952) dagegen erhielt nach Injektion von Corpora allata-Extrakten einen höheren Prozentsatz von Afterweiseln als bei den Kontrollgruppen. Damit scheint eine stimulierende Wirkung des Corpora allata-Hormons auf die Ovarentwicklung auch bei Bienen nachgewiesen zu sein.

Wir haben uns deshalb die Frage gestellt, ob das Bienenköniginnen-Pheromon durch eine Hemmung der Corpora allata die Eireifung bei den Arbeiterinnen verhindert. Zur Prüfung dieser Frage haben wir verwaisten Gruppen von etwa 100 Bienen Königinnen-Extrakt verabreicht und die Volumina der Corpora allata

in Versuchs- und Kontrollgruppen nach verschiedenen Zeitintervallen bestimmt. Versuchs- und Kontrollgruppen wurden jeweils dem gleichen Volk entnommen.

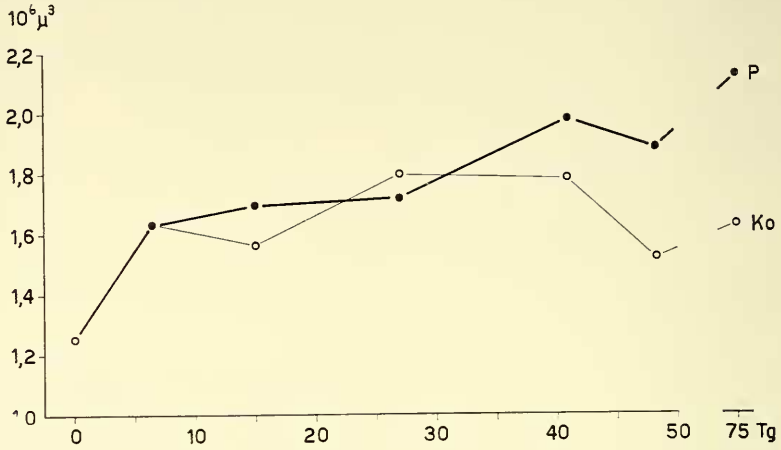

Abb. 1.

Gesamtvolumen der beiden Corpora allata in Millionen μ^3 von weisellosen Bienen in Abhängigkeit von der Nahrung.
Ko: Zucker-Honig-Gemisch — Kontrolle.
P: Zucker-Honig-Gemisch mit Pollenzusatz.
Tg: Tage nach Beginn der Weisellosigkeit (Stockentnahme).
Pro Kurvenpunkt wurden die Corpora allata von 6-18 Bienen gemessen.

Da die Versuche erst im letzten Winter begonnen wurden, standen uns nur Winterbienen zur Verfügung. Wir haben mit den Rassen „carnica" und „nigra" gearbeitet. Die Bienen wurden in sog. Liebefelder Kästchen bei 30° C gehalten und mit Honig und Zucker, zum Teil zusätzlich mit Pollen gefüttert. Der Königinnenextrakt war ein ungereinigter Extrakt, der uns im Jahre 1957 durch Herrn Dr. C. G. Butler zur Verfügung gestellt worden ist. Er war also schon über fünf Jahre alt. Der Extrakt wurde auf einer der extrahierten Königinnen verabreicht. Diese wurde getränkt, getrocknet und in das betreffende Kästchen gelegt.

Die Corpora allata wurden in Insekten-Ringer herauspräpariert und im Frischzustand in einer Zählkammer von 0,025 mm Tiefe gequetscht. Der Umriss des gequetschten Organs wurde mit dem Zeichenapparat gezeichnet. Die Fläche der Organs, aus der sich dann das Volumen berechnen liess, wurde durch Planimetrieren bestimmt.

Zur statistischen Bearbeitung wurden folgende Methoden benützt: der χ^2-Vierfeldtest, der Test von Wilcoxon, die Sequentialanalyse und die Varianzanalyse (siehe Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen).

Der Prozentsatz der bei den Winterbienen in Kontrollkolonien entstandenen Afterweisel war von Volk zu Volk sehr verschieden und schwankte zwischen 4 und 66%, wobei ein Rassenunterschied nicht festgestellt werden konnte.

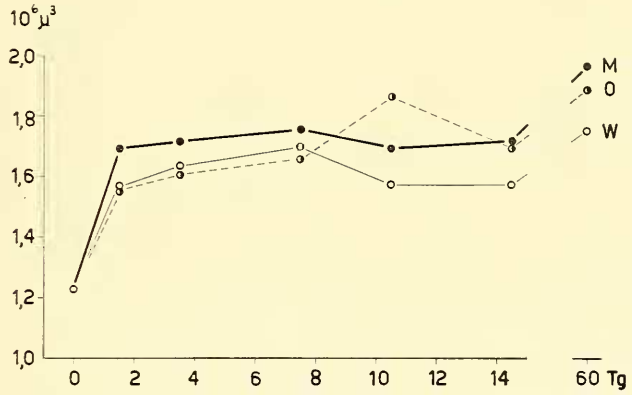

Abb. 2.

Die Einwirkung der Kästcheneinrichtung auf das Volumen der Corpora allata von weisellosen Bienen.
W: Kästchen mit normalen Bienenwachswaben.
M: Kästchen künstlicher Mittelwand.
O: Kästchen ohne Wabe und ohne Mittelwand.
Anzahl untersuchter Tiere pro Kurvenpunkt: 8.
Weitere Erklärungen siehe unter Abb. 1.

Wir haben zunächst das Verhalten der Corpora allata in weisellosen Gruppen unter verschiedenen Bedingungen ohne Verabreichung von Königinnensubstanz untersucht (Abb. 1, 2). Es zeigt sich durchwegs eine starke Volumenzunahme in den ersten Tagen. Später nimmt das Volumen nur noch wenig zu oder es bleibt konstant. Ein Zusatz von Pollen zur Nahrung hat zunächst keinen Einfluss auf die Corpora allata (Abb. 1). Nach etwa fünf Wochen jedoch werden die Corpora allata der pollenernährten Bienen deutlich grösser als diejenigen der Kontrollen. Dagegen war der Prozentsatz der Bienen mit entwickelten Ovarien in der Kontrollgruppe höher (66%) als bei Pollenzusatz (45%). Für den Unterschied ergibt sich ein $P < 0{,}05$.

Dieses Ergebnis scheint den Befunden von Pain (1961b), nach denen Proteinnahrung eine Voraussetzung für die Entwick-

lung von Eiern bei Arbeiterinnen ist, zu widersprechen und ist vielleicht auf den besonderen physiologischen Zustand der Winterbienen zurückzuführen.

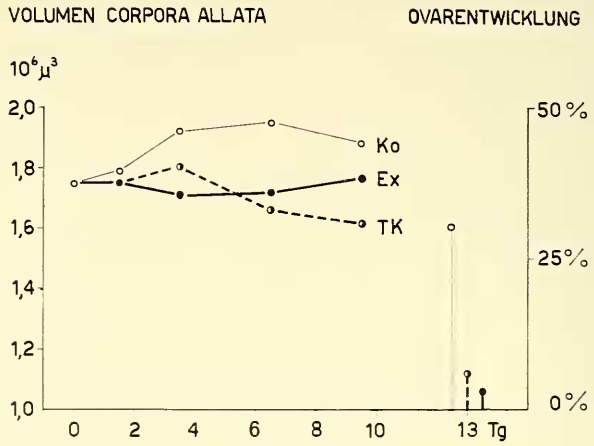

Abb. 3.

Erster Versuch über die Wirkung der Königinnensubstanz auf die Corpora allata und auf die Ovarentwicklung von weisellosen Bienen.
Ex: Königinnenextrakt auf extrahierter Königin verabreicht.
TK: Stockeigene tote Königin.
Ko: Weisellose Kontrollen.
Anzahl untersuchter Tiere pro Kurvenpunkt: 8, für die Ovarentwicklung: 66.
Weitere Erklärungen siehe unter Abb. 1.

Wird der weisellosen Bienengruppe statt der vollständigen Wabe nur die Mittelwand mit künstlich eingepresstem Wabenmuster in das Kästchen gehängt, so werden die Corpora allata gesichert ($P < 0{,}01$) grösser als bei Kontrollgruppen mit normalen Waben (Abb. 2). Die Bienen entwickelten in diesem Versuch eine starke Bautätigkeit, indem sie Wachs von der Mittelwand abtrugen und damit Ritzen zwischen Glas und Holzrahmen verschlossen. Bei Bienen in leeren Kästchen ist die Volumenvergrösserung der Corpora allata unregelmässig und nicht gesichert verschieden von derjenigen der beiden andern Gruppen. In der Ovarentwicklung zeigten sich keine Unterschiede, doch war diese bei allen Gruppen äusserst gering (höchstens 6%).

Die Wirkung der Königinnensubstanz wurde in zwei Versuchen geprüft. Im ersten Versuch (Abb. 3) wurden einem kleinen Stamm-

volk, dessen Königin kurz vorher gestorben aber noch im Volk verblieben war, drei Gruppen entnommen, von denen eine Königinnen-substanz erhielt (Ex). Einer zweiten Gruppe wurde die dem Volk entnommene tote Königin in das Kästchen gegeben (TK).

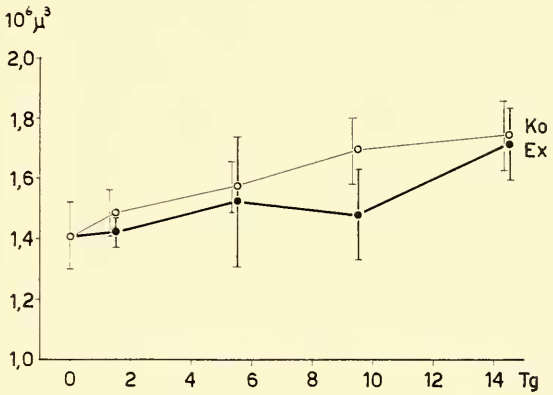

Abb. 4.
Zweiter Versuch mit Königinnensubstanz.
Erklärungen siehe unter Abb. 1 und 3.

Die Corpora allata waren schon zu Beginn des Versuchs sehr gross, wahrscheinlich infolge des Absterbens der Königin. Die Corpora allata der weisellosen Kontrollbienen nahmen jedoch nach Versuchsbeginn weiter an Volumen zu, während ihr Wachstum sowohl bei Verabreichung von Königinnensubstanz als auch durch die tote Königin gesichert ($P < 0{,}01$) gehemmt war. Auch die Hemmung der Ovarentwicklung in diesen Gruppen ist gesichert, und zwar für die Königinnensubstanz mit $P < 0{,}0001$, für die tote Königin mit $P < 0{,}001$. Diese scheint also an ihrer Oberfläche noch Königinnensubstanz aufgewiesen zu haben.

Für den zweiten Versuch (Abb. 4) wurden die Bienen einem normalen grossen Volk entnommen und in zwei Gruppen aufgeteilt, von denen die eine Königinnensubstanz erhielt und die andere als Kontrolle weisellos blieb. In beiden Gruppen zeigte sich mit der Zeit eine Volumenzunahme der Corpora allata, doch waren auch hier diejenigen der Versuchsgruppe im Vergleich mit der Kontrolle gehemmt ($P < 0{,}05$). In diesem Versuch wurde eine Vergrösserung der Streuung unter der Einwirkung von Königinnen-

substanz beobachtet ($P < 0{,}01$). Zudem sind einzelne s-Werte innerhalb der Versuchsgruppe voneinander gesichert verschieden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Corpora allata nur teilweise und unregelmässig gehemmt wurden. Der Prozentsatz der Bienen mit Ovarentwicklung betrug bei den Kontrollen 8%, bei den Versuchsbienen 0%, doch ist dieser Unterschied nicht gesichert.

Die Versuche zeigen, dass bei Verabreichung von Königinnensubstanz eine normalerweise nach der Isolierung von der Königin auftretende Vergrösserung der Corpora allata der verwaisten Arbeiterinnen verhindert oder zumindest gehemmt wird, während gleichzeitig die Eireifung in den Ovarien ebenfalls verhindert oder gehemmt wird. Nach Untersuchungen bei anderen Insekten darf aus einer Volumenzunahme der Corpora allata im allgemeinen auf eine Aktivierung derselben geschlossen werden. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Wirkung des ovarhemmenden Pheromons der Bienenkönigin die Corpora allata der Arbeiterinnen in ihrer Hormonproduktion hemmt, und dass die Eireifung infolge des Fehlens des sog. gonadotropen Hormons der Corpora allata unterbleibt.

Innerhalb der Gruppen die keine Königinnensubstanz erhielten ergab sich jedoch keine Korrelation zwischen der Grösse der Corpora allata und der Ovarentwicklung (107 geprüfte Tiere, wovon 61 Ovarentwicklung zeigten). Dies weist darauf hin, dass trotz Aktivierung der Corpora allata die Ovarien mindestens bei Winterbienen nicht immer zur Eibildung fähig sind, dass also ein Ausbleiben der Eireifung in Abwesenheit der Königinnensubstanz nicht einer Mangelfunktion der Corpora allata zuzuschreiben ist.

Für eine Wirkung der Königinnensubstanz auf die Corpora allata sprechen auch unveröffentlichte Befunde bei Termiten, die zeigen, dass bei diesen die Corpora allata nach Verfütterung von Bienen-Königinnensubstanz gehemmt werden, und dass die Wirkung dieser Substanz auf die Bildung von Ersatzgeschlechtstieren derjenigen von Juvenilhormonextrakten entgegengesetzt ist.

Summary

The corpora allata of worker honey-bees increase in volume during the first days after their removal from the queen. The " queen substance " significantly inhibits this growth of the corpora

allata. These results suggest that the inhibition of ovary development by the pheromone contained in the " queen substance " is brought about by an action upon the corpora allata which are thereby prevented from secreting the " gonadotropic " hormone.

LITERATURVERZEICHNIS:

ALTMANN, G. 1952. *Die Lokalisation der Sexualwirkstoffe bei der Honigbiene.* Z. Bienenforsch. 1: 124-127.

BARBIER, M. und LEDERER, E. 1960. *Structure chimique de la « substance royale » de la reine d'abeille (Apis mellifica).* C.R. Acad. Sci., Paris, 250: 4467-4469.

BARBIER, M., LEDERER, E. und NOMURA T. 1960. *Synthèse de l'acide céto-9 décène-2-trans oique (substance royale) et de l'acide céto-8 nonène-2-trans oique.* C.R. Acad. Sci., Paris, 251: 1133-1135.

BUTLER, C. G. 1954. *The method and importance of the recognition by a colony of honeybees of the presence of its queen.* Trans. R. ent. Soc. London, 105: 11-29.

CALLOW, R. K. und JOHNSTON, N. C. 1960. *The chemical constitution and synthesis of queen substance of honeybees.* Bee world, 41: 152-153.

LÜSCHER, M. 1961. *Social control of polymorphism in termites.* In J.S. KENNEDY: Insect polymorphism, London, pp. 57-67.

MÜSSBICHLER, A. 1952. *Die Bedeutung äusserer Einflüsse und der Corpora allata bei der Afterweiselentstehung von Apis mellifica.* Z. vergl. Physiol., 34: 207-221.

PAIN, J. 1954. *Sur l'ectohormone des reines d'Abeilles.* C.R. Acad. Sci., Paris, 239: 1869-1870.

PAIN, J. 1961a. *Sur la phérormone des reines d'Abeilles et ses effets physiologiques.* Thèse, Paris.

PAIN, J. 1961b. *Sur quelques facteurs alimentaires, accélérateurs du développement des œufs dans les ovaires des ouvrières d'Abeilles (Apis m. L.).* Ins. Soc., 8: 31-93.

VOOGD, S. 1955. *Inhibition of ovary development in worker bees by extraction fluid of the queen.* Experientia, 11: 181-184.